

УДК 577.152.3

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДУОДЕНАЗЫ С ИНГИБИТОРАМИ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Н.А. Попыкина, И.П. Гладышева, Н.Г. Балабушевич, Т.С. Замолодчикова\*,  
Н.И. Ларионова

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: nilar@enzyme.chem.msu.ru.)

**Изучено взаимодействие дуоденазы – новой сериновой протеиназы, принадлежащей к немногочисленному классу “двуликих” протеиназ, с химостатином и лейпептином. Константа ингибирования ( $K_{инг}$ ) химостатином гидролиза дуоденазой субстратов Suc-Ala-Ala-Phe-pNA и N-t-Boc-O-Bz-Ser-Gly-Arg-pNA составила  $63 \pm 4$  нМ. Показано, что при смене химотрипсинового субстрата на трипсиновый ингибирование меняет конкурентный характер на бесконкурентный. При изучении ингибирования дуоденазы изопропионил-лейпептином показано, что 50% ингибирование достигается при соотношении  $[I]_0/[E]_0 = 2000$ .**

Дуоденаза, сериновая протеиназа кишечника [1], локализована в секреторных гранулах эпителиальных клеток бруннеровых желез дуоденальной слизистой [2]. Доказано, что дуоденаза принимает участие в активации проэнтеропептидазы – одноцепочечного предшественника энтеропептидазы [3].

Таким образом, дуоденаза, активируя проэнтеропептидазу, может играть центральную роль в инициации каскада реакций протеолитического расщепления, приводящих к активации панкреатических ферментов. Кроме того, последние исследования показали, что дуоденаза способна активировать PAR рецепторы [4], что не исключает ее роли в воспалительных процессах, происходящих в организме. Субстратная специфичность дуоденазы необычна – она проявляет свойства трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ [2]. Так, по отношению к синтетическим и белковым субстратам трипсиноподобная активность дуоденазы выражена более ярко, чем химотрипсиноподобная. Однако при взаимодействии с белковыми ингибиторами протеиназ как аналогами субстратов дуоденаза проявляет свои химотрипсиноподобные свойства [5].

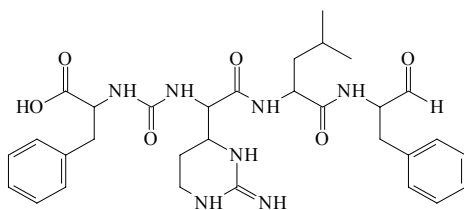
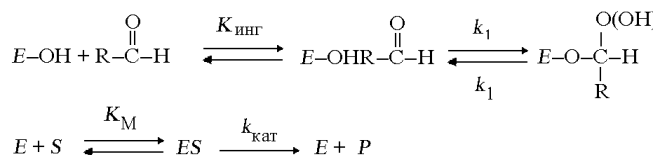
В данной работе исследовано взаимодействие дуоденазы с ингибиторами микробного происхождения – химостатином и изопропионил-лейпептином. Эти ингибиторы могут быть использованы в качестве противовоспалительных и противораковых средств [6]. Известно, что химостатин и лейпептин являются мощными конкурентными ингибиторами ряда сериновых и цистеиновых протеиназ и рассматриваются как пептидил-альдегидные аналоги “переходного состояния” [7]. Ингибирование обусловлено образованием полуацеталей или тиоацеталей с каталитически активными группами сериновых или цистеиновых протеиназ и сопровождается конформационными перестройками в белке (схема 1) [8, 9]. Химостатин ингибирует ферменты, обладающие химотрипсиноподобной субстратной специфичностью [8, 10, 11], а лейпептин – ферменты с трипсиноподобной субстратной специфичностью [8].

### Материалы и методы

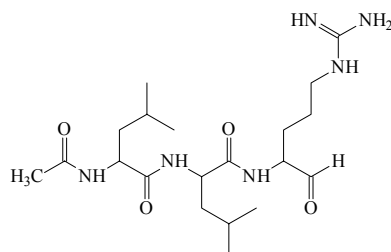
В работе использованы следующие реактивы: Трипсин быка,  $\alpha$ -химотрипсин быка, “Merck” (Германия); Tris-оксиметиламинометан (трис-HCl), – “ICN”

## Схема 1

## Механизм ингибирования сериновых протеиназ ингибиторами микробного происхождения



Химостатин А



Лейпептин

(США); соевый ингибитор типа Баумана–Бирк (ВБИ); этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина (Bz-Arg-EE), этиловый эфир N-бензоил-L-тирозина (Bz-Tyr-EE), Suc-Ala-Ala-Phe-pNA, Tos-Gly-Pro-Lys-pNA, N-t-Boc-O-Bz-Ser-Gly-Arg-pNA – “Sigma” (США) (остальные реактивы были марки “о.с.ч.”, “х.ч.” и “ч.д.а.”). Все спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре “Shimadzu UV-265FW” (Япония).

Препарат ВБИ обладал 100%-й антитрипсиновой и 86%-й антихимотрипсиновой активностью. Содержание активных центров в препарате трипсина, определенное методом [12], составляло 61%.

**Выделение и определение активности дуоденазы.** Дуоденазу выделяли из дуоденальных желез быка методом аффинной хроматографии на соевом ингибиторе протеиназ типа Кунитца, иммобилизованном на сефарозе 4В [1]. Содержание белка в препарате дуоденазы определяли методом Лоури и др. [13]. Содержание активных центров дуоденазы определяли как путем ее титрования ВБИ с известной активностью [6].

**Определение  $k_{кат}$  и  $K_M$ .** Измерение кинетических и равновесных параметров гидролиза N-t-Boc-O-Benzyl-Ser-Gly-Arg-pNA проводили по изменению скорости его гидролиза от концентрации субстрата. Величину констант рассчитывали по уравнению Лайнуивера–Берка [14] и уравнению Иди [14]. Полученные  $k_{кат}$  и  $K_M$  для гидролиза N-t-Boc-O-Benzyl-Ser-Gly-Arg-pNA, катализируемого дуоденазой при pH 8,0 и  $T = 37^\circ$ ,

составляли  $0,1 \text{ с}^{-1}$  и  $0,013 \text{ мМ}$  соответственно.

**Определение констант ингибирования ( $K_{инг}$ ) дуоденазы химостатином и изопропионил-лейпептином.** При исследовании ингибирования химостатином и изопропионил лейпептином гидролиза дуоденазой пептидных субстратов, фермент с ингибиторами предварительно инкубировали в течение 8 мин при pH 8,0 и  $T = 37^\circ$ , концентрацию химостатина варьировали в пределах 0–2 мМ, концентрацию изопропионил-лейпептина варьировали в пределах 0–40 мМ, концентрация фермента составляла 0,22 мМ, концентрации субстратов Suc-Ala-Ala-Phe-pNA, N-t-Boc-O-Bz-Ser-Gly-Arg-pNA – 19 и 43 мМ соответственно. Длина волны 405 нМ. Константы ингибирования, коэффициенты  $\alpha$  и  $\beta$ , приведенные в табл. 1, определяли методом нелинейной регрессии по уравнению (1) [15]:

$$A = \frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{2} \left[ \frac{\alpha + \sigma - \beta(1 - \sigma)}{\alpha + \sigma} \right] \left\{ \sqrt{\left[ \left( \frac{1 + \sigma \alpha K_{инг}}{\alpha + \sigma [E]_0} + \frac{[I]_0}{[E]_0} - 1 \right)^2 + 4 \frac{1 + \sigma \alpha K_{инг}}{\alpha + \sigma [E]_0} \right]} \right. \\
 \left. + \frac{\alpha + \sigma + \beta(1 + \sigma)}{\alpha + \sigma - \beta(1 + \sigma)} - \frac{1 + \sigma \alpha K_{инг}}{\alpha + \sigma [E]_0} - \frac{[I]_0}{[E]_0} \right\},$$

где  $A$  – остаточная активность фермента;  $v_i$  – начальная скорость реакции в присутствии ингибитора;  $v_0$  – начальная скорость реакции в отсутствие ингибитора;  $\sigma = [S]_0 / K_M$ ;  $[S]_0$  – начальная концентрация субстрата;  $K_M$  – константа Михаэлиса;  $[I]_0$  –

Т а б л и ц а 1

С х е м а 2

**Константы ингибирования дуоденазы химостатином**

Субстрат	Параметры ингибирования
Suc-Ala-Ala-Phe-pNA	$K_{инг} = 60$ нМ $\alpha = 2,87$ $\beta = 0,28$
Nt-Вос-o-Bz-Ser-Gly-Arg-pNA	$K_{инг} = 67$ нМ $\alpha = 0,14$ $\beta = 0,37$

Т а б л и ц а 2

**Константы ингибирования химотрипсиноподбных ферментов химостатином**

Фермент	$K_{инг}$ , нМ
Химотрипсин	0,4 [11, 12]
Химаза тучных клеток человека	1,33 [12]
Катепсин G	150 [11]

общая концентрация ингибитора;  $[E]_0$  – общая концентрация фермента.

**Результаты и их обсуждение**

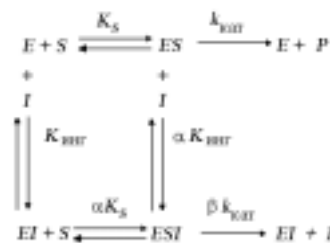
Взаимодействие дуоденазы с химостатином. При взаимодействии дуоденазы с химостатином эффект ингибирования наблюдался при близких концентрациях фермента и ингибитора. Было сделано предположение, что химостатин может взаимодействовать с дуоденазой по механизму обратимого гиперболического прочносвязывающего ингибирования. Однако теоретические кривые, рассчитанные для конкурентного связывания дуоденазы с субстратом и химостатином (схема 1), не соответствовали экспериментальным результатам.

Поэтому для описания взаимодействия химостатина с дуоденазой была использована следующая схема 2 [15].

На рис. 1 и 2 представлены зависимости химотрипсиноподобной и трипсиноподобной активностей дуоденазы от соотношения концентрации химостатина к ферменту и теоретические кривые, рассчитанные по уравнению 1 соответственно. Параметры ингибирования приведены в табл. 1.-

Полученные данные указывают на то, что в реакции гидролиза субстрата Suc-Ala-Ala-Phe-pNA химостатин проявляет гиперболический смешанный тип ингибирования ( $1 < \alpha < \infty$ ,  $0 < \beta < 1$ ). Это означает, что первичное связывание химостатина или субстрата с ферментом ухудшает последующее связывание субстра-

**Механизм ингибирования дуоденазы химостатином**



Примечания. E – фермент; I – ингибитор; S – субстрат; P – продукт;  $K_{инг} = [E][I]/EI$ ;  $\alpha K_{инг} = [ES][I]/[ESI]$ ;  $K_s = [E][S]/[ES]$ ;  $\alpha K_s = [EI][S]/[ESI]$ ;  $\alpha$  и  $\beta$  – коэффициенты

та или химостатина соответственно. В случае гидролиза субстрата, имеющего Arg в P<sub>1</sub> положении, ситуация меняется: ингибирование носит гиперболический бесконкурентный характер ( $0 < \alpha < 1$ ,  $0 < \beta < 1$ ). В данном случае связывание одного из двух компонентов с ферментом усиливает связывание второго компонента. Это может быть обусловлено разными причинами, в том числе и конформационными изменениями.

Дуоденаза проявляет высокую степень структурной гомологии с катепсином G и химазой тучных клеток человека [16, 17]. Константы ингибирования этих протеиназ химостатином приведены в табл. 2. Химостатин является конкурентным ингибитором этих ферментов (схема 1). Так как константы ингибирования катепсина G и химотрипсина значительно отличаются (примерно в 400 раз), а константы скорости диссоциации примерно одинаковы, можно предположить участие дополнительных точечных взаимодействий в районе активного центра в дополнительной стабилизации ковалентного комплекса, что приводит к его высокой устойчивости [10]. Из табл. 2 можно видеть, что у химотрипсина и химазы тучных клеток человека (фермента, обладающе-

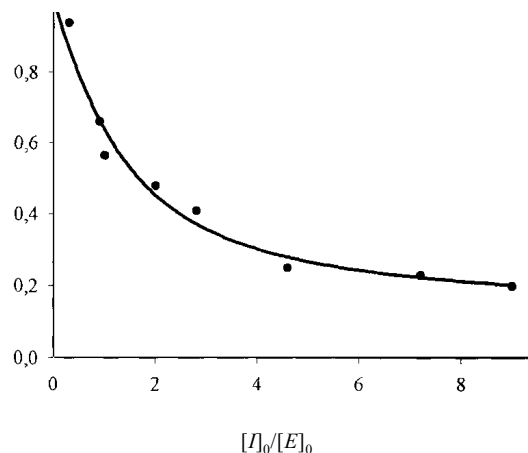


Рис. 1. Ингибирование дуоденазы химостатином: субстрат – Suc-Ala-Ala-Phe-pNA, 19 мМ;  $[E]_0 = 0,22$  мМ; время инкубации 8 мин;  $T = 37^\circ$ ; pH 8,0 (теоретический расчет по уравнению 1)

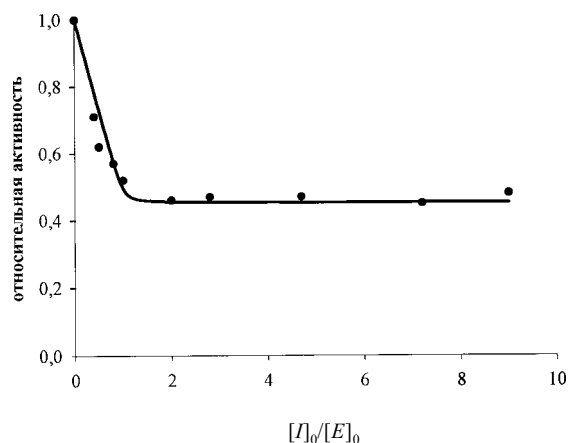


Рис. 2. Ингибирование дуоденазы химостатином: субстрат – *N*-*t*-Woc-O-Bz-Ser-Gly-Arg-pNa, 43 мМ;  $[E]_0 = 0,22$  мМ; время инкубации 8 мин;  $T = 37^\circ$ ; pH 8,0 (теоретический расчет по уравнению 1)

го химотрипсиноподобной специфичностью) константы ингибирования на порядок выше, чем у ферментов с двойной специфичностью – дуоденазы и катепсина G.

Изменение механизма ингибирования протеиназ с двойной специфичностью при смене субстрата можно объяснить следующим образом. Природа химотрипсиноподобной специфичности дуоденазы и катепсина G до сих пор не установлена. Однако известно, что при замене Arg-226 в связывающем кармане гранзима B (фермента высоко гомологичного вышеперечисленным) на Gly гранзим B утрачивает активность по отношению к субстратам, имеющим отрицательно заряженные аминокислотные остатки в  $P_1$ -положении, но сохраняет способность расщеплять субстраты с гидрофобными остатками в  $P_1$ -положении [18]. Плетнев с соавторами [17] предположил, что остаток Asp-226 в дуоденазе и Glu-226 в катепсине G не является необходимым для связывания Phe (Tyr) в положении  $P_1$  лиганда. При этом электростатическое взаимодействие положительно заряженного аминокислотного остатка в  $P_1$  положении субстрата с отрицательно заряженным Asp (Glu)-226 вносит большой вклад в стабилизацию фермент-субстратного комплекса [19]. Вероятно, химостатин связывается в гид-

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-49848.

### Константы ингибирования трипсиноподобных ферментов лейпептином

Фермент	$K_{инг}$ , нМ
Трипсин	13,4 [21]
Плазмин	1000 [22]

рофобном кармане дуоденазы таким образом, что не только не мешает, но, как показывают полученные нами экспериментальные данные, даже усиливает связывание положительно заряженных субстратов. Следовательно, наряду с комплексом фермент–ингибитор и фермент–субстрат, возможно образование тройного комплекса фермент–ингибитор–субстрат, что соответствует механизму бесконкурентного ингибирования.

**Взаимодействие дуоденазы с лейпептином.** При исследовании ингибирования гидролиза субстрата Tos-Gly-Pro-Lys-pNA изопропионил-лейпептином было показано, что при соотношении концентрации ингибитора к ферменту  $[I]_0/[E]_0 = 2000$  наблюдалось 50%-е ингибирование, т.е.  $K_{инг}$  по грубой оценке имеет порядок  $10^{-4}$  М. Константы ингибирования трипсина [21] и плазмина [22] лейпептином приведены в табл. 3. Конечно, эти величины значительно меньше оцененной нами константы ингибирования дуоденазы, однако здесь проявилась ее двойная специфичность, так как на химазу тучных клеток и катепсин G лейпептин не оказывает ингибирующего действия [23].

Слабое ингибирование дуоденазы лейпептином неудивительно, так как пептидный субстрат аналогичного строения Ac-Leu-Leu-Arg-pNA является одним из наилучших субстратов, связывающихся с дуоденазой [2].

Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что механизм взаимодействия дуоденазы как представителя класса “двуликих” протеиназ с химостатином зависит от субстрата (гидрофобного или заряженного). Лейпептин же является слабым ингибитором дуоденазы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zamolodchikova T.S., Vorotyntseva T.I., Antonov V.K. // Eur. J. Biochem. 1995. **227**. P. 866.
- Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Alexandrov S.L. et al. // Eur. J. Biochem. 1997. **249**. P. 612.
- Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Deshun L., Sadler J.E. // FEBS Lett. 2000. **466**. P. 295.
- Pemberton A.D., Zamolodchikova T.S., Scudamore C.L. et al. // Eur. J. Biochem. 2002. **269**. P. 1171.
- Гладышева И.П., Замолодчикова Т.С., Соколова Е.А., Ларионова Н.И. // Биохимия. 1999. **64**. С. 1473.
- Umezawa H. // Methods Enzymology. 1976. **45**. P. 678.
- Lienhard G.E. // Science. 1973. **180**. P. 149.
- Антонов В. К. Химия протеолиза. М., 1991. С. 215, 255.
- Matis J.A., Henes J.B., Fruton J.S. // J.Biol.Chem. 1977. **252**. P. 6776.
- Stein R.L., Strimpler A.M. // Biochemistry. 1987. **26**. P. 2611.
- Johnson L.A., Moon K.E., Eisenberg M. // BBA. 1988. **953**. P. 269.
- Chase T., Shaw E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. **269**. P. 508.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall, R.J. // J. Biol. Chem. 1951. **193**. P. 265.
- Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976. С. 79, 168, 219.

15. *Szedlacsek S.E., Ostafe V., Serban M., Vlad M.O.* // *Biochem J.* 1988. **254**. P. 311.
16. *Zamolodchikova T.S., Vorotyntseva T.I., Nazimov T.V., Grishina G.A.* // *Eur. J. Biochem* 1995. **227**. P. 873.
17. *Pletnev V.Z., Zamolodchikova T.S., Pangborn. W.A., Duax W.L.* // *Proteins*. 2000. **41**. P. 8.
18. *Caputo A., James M.N.G., Powers J.C. et al.* // *Nat. Struct. Biol.* 1994. **1**. P. 364.
19. *Kuramochi H., Nakata H., Ishil S.* // *J. Biochem (Tokyo)*. 1979. **86**. P. 1403.
20. *Cummings H.S., Castellino F.J.* // *Biochemistry* 1984. **23**. P. 105.
21. *Nakagawa H., Suzuki M., Shuto K. et al.* // *J. Pharmacobidyn.* 1982. **5**. P. 319.

Поступила в редакцию 25.10.02